



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**GRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

## **TRABAJO DE FIN DE GRADO**

**Control biológico de plagas: pesticidas microbianos**

Autor: Nicoleta Mihaela Balcan

Tutor/es: María del Carmen Fajardo Adán

2021

## **RESUMEN**

El constante crecimiento de la población mundial y la consecuente demanda de producción alimentaria requieren que las pérdidas de cultivos por plagas y enfermedades se reduzcan de manera drástica. Los pesticidas químicos convencionales suponen un impacto negativo sobre el ambiente y la salud humana, y mayores costes de producción, por lo que, en los últimos años, se han venido desarrollando nuevas estrategias. En este contexto, el control biológico de plagas, y, de forma particular, el empleo de microorganismos como agentes de biocontrol se ha convertido en una opción prometedora y ambientalmente sostenible. En este trabajo se pretende hacer una revisión acerca del papel de las bacterias, hongos y virus como supresores de enfermedades de plantas, así como los principales mecanismos de acción implicados y el avance del mercado de este tipo de productos fitosanitarios. Tras una exhaustiva lectura, se ha llegado a la conclusión de que los microorganismos resultan una opción beneficiosa de protección para reducir el uso intensivo de los productos sintéticos que tanto nos dañan, contribuyendo así al desarrollo de biopesticidas más eficientes e impulsando la adopción de esta alternativa sostenible de control de plagas.

## **PALABRAS CLAVE**

Control biológico, biopesticidas, microorganismos, plagas, patógenos, agentes de biocontrol

## **ABSTRACT**

The constant growth of the world population and the consequent demand for food production require that crop losses due to pests and diseases be drastically reduced. Conventional chemical pesticides have a negative impact on the environment and human health, and higher production costs, so new strategies have been developed in recent years. In this context, biological pest control and, in particular, the use of microorganisms as biocontrol agents has become a promising and environmentally sustainable option. In this work, the aim is to review the role of bacteria, fungi and viruses as plant disease suppressors, as well as the main mechanisms of action involved and the progress of the market for this type of phytosanitary products. After an exhaustive reading, it has been concluded that microorganisms are a beneficial protection option to reduce the intensive use of synthetic products that damage us so much, thus contributing to the development of more efficient biopesticides and promoting the adoption of this sustainable alternative for pest control.

## **KEY WORDS**

Biological control, biopesticides, microorganisms, pests, pathogens, biocontrol agents

## ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Materiales y métodos .....	4
3. Resultados y discusión.....	5
3.1. Técnicas de control de plagas.....	5
3.1.1. Métodos convencionales .....	5
3.1.2. Pesticidas químicos.....	6
3.1.3. Biopesticidas .....	8
3.2. Tipos de biopesticidas .....	8
3.2.1. Bioquímicos.....	8
3.2.2. Protectores Incorporados en Plantas (PIP) .....	10
3.2.3. Microbianos .....	11
3.3. Mecanismos de acción de biopesticidas microbianos .....	12
3.3.1. Amensalismo .....	13
3.3.2. Competencia .....	14
3.3.3. Parasitismo.....	15
3.3.4. Depredación .....	16
3.3.5. Inducción de Resistencia.....	17
3.4. Principales microorganismos usados como agentes de biocontrol ....	19
3.4.1. Bacterias .....	19
3.4.2. Hongos .....	21
3.4.3. Virus .....	22
3.5. Datos de mercado y perspectivas futuras .....	23
4. Conclusión.....	25
5. Bibliografía .....	26
Anexo I. Tablas .....	40
Anexo II. Figuras .....	44

## 1. INTRODUCCIÓN

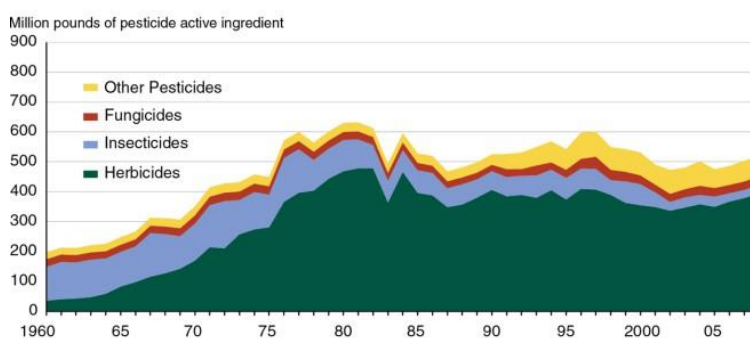
Los suelos nos proporcionan servicios ecosistémicos cruciales para satisfacer las necesidades humanas, entre ellos, el suministro de alimentos a través de la agricultura o el abastecimiento de biomateriales y recursos energéticos, cuya producción se ha visto incrementada en el último siglo (Dominati *et al.*, 2014; Kopitkke *et al.*, 2019).

La producción agrícola se caracteriza por ser un recurso más bien inmediato, por lo que las técnicas agrícolas deben dar respuesta al crecimiento poblacional que estamos sufriendo. Según algunos estudios realizados, se calcula que la población mundial podría alcanzar los 9,4 billones de habitantes en el año 2050 (United Nations, 2015), por lo que es evidente que deben conseguirse sistemas agrícolas de alta productividad que puedan hacer frente a la creciente demanda; así, en un trabajo realizado por Economics of Land Degradation (ELD) en 2015 se estima que será necesario aumentar su productividad en un 70 %. Por otro lado, los sistemas agrícolas no solo deben aumentar su rendimiento, sino que, atendiendo a los patrones actuales de consumo, también deben mejorar la seguridad y la calidad de los productos obtenidos.

Una manera de fomentar la disponibilidad de alimentos, biomateriales y recursos energéticos es mediante el control de plagas y enfermedades de las plantas, que pueden llegar a limitar el 40 % del rendimiento de los cultivos (Chandler *et al.*, 2011). Los principales organismos causantes de estos problemas son los insectos, además de los hongos, oomicetos, bacterias, virus y organismos similares, viroides, fitoplasmas, protozoos, nematodos o plantas parásitas (Ghorbanpour *et al.*, 2018). Algunos trabajos sostienen que las enfermedades vegetales más destructivas son de origen fúngico, las cuales pueden, por ejemplo, destruir incluso el 30 % de la producción anual de arroz (Van Alfen, 2001); así mismo, hay estimaciones que situaron las pérdidas globales de trigo o algodón en el período 2001-2003 debido a enfermedades vegetales en torno al 50 % y el 80 %, respectivamente (Oerke, 2005). Esta problemática tiene un notable impacto sobre la economía, y un claro ejemplo es la pérdida anual de 6.700 millones de dólares registrada en EE. UU. a causa de la acción de *Phytophthora infestans* en los cultivos de patata, o los 1.000 millones de dólares

que se pierden a causa de la acción de *Helminthosporium maydis* en los cultivos de maíz estadounidenses (Rahman *et al.*, 2018).

Para luchar contra las plagas y enfermedades de las plantas, la agricultura intensiva tradicional ha venido empleando desde hace más de 70 años la aplicación de plaguicidas sintéticos para atacar a los patógenos, y de fertilizantes para potenciar la biomasa de los cultivos, de tal manera que se prevé que, para hacer frente a la alta demanda actual, será necesario emplear entre 10 y 2,7 veces más, respectivamente, de estos productos (Rohr *et al.*, 2019). La FAO afirmó en 2013 que la mayor cantidad de pesticidas usados durante el período 2005-2009 fueron aplicados en el continente americano y en China, siendo los más utilizados los herbicidas, como el glifosato, seguido de los insecticidas, como las piretrinas y los fungicidas como el cloruro de cobre (Carvalho, 2017), tal y como ilustra la Figura 1 sobre el uso de estos compuestos en el mercado americano.



**Figura 1:** Tendencia de uso de productos pesticidas en EE. UU. en el período 1960-2008 (Seiber *et al.*, 2014).

Sin embargo, a pesar de ser una herramienta útil, estos productos fitosanitarios tienen una serie de inconvenientes, como ser poco sostenibles económicamente. Para ilustrar este aspecto, basta considerar que la producción de un solo ingrediente “activo”, que tiene una tasa de éxito de 1 entre 140.000 compuestos que se sintetizan, tiene un coste estimado en torno a los 250 millones de dólares (Lamberth *et al.*, 2013).

Por otro lado, muchas sustancias usadas como pesticidas tienden a bioacumularse en los organismos, presentando toxicidad aguda o crónica y efectos nocivos en la salud humana. Por ejemplo, algunos productos como el DDT necesitan apenas 5 g para ser tóxicos para el hombre (Ferrer, 2003). Entre

los efectos más comunes que producen los pesticidas sintéticos sobre la salud humana se encuentran las afecciones dérmicas, náuseas y vómitos, daños en la inmunidad del afectado, disrupción endocrina y enfermedades cancerígenas (Meftaul *et al.*, 2020).

Desde el punto de vista ambiental, la contaminación por pesticidas afecta tanto al aire, como al agua y al suelo (Sharma y Singhvi, 2017). Los pesticidas químicos aplicados sobre suelos agrícolas provocan serios problemas de contaminación; por ejemplo, en China la acumulación de metales pesados, como Cu, Cd y Pb, puede llegar a contaminar incluso el 20 % del suelo cultivable (Lu *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2019). Pero, además, los contaminantes pueden llegar a alcanzar masas de agua subterráneas y superficiales a través de la escorrentía y la infiltración (Aktar *et al.*, 2009).

Por otra parte, los pesticidas sintéticos tienen el inconveniente de dañar no solo a la plaga que se quiere extinguir, sino también a otros organismos no objetivo, como a especies polinizadoras que juegan un papel ambiental importante. Esto no sólo conlleva una gran pérdida de la biodiversidad, sino que, la aplicación excesiva de plaguicidas se relaciona con la pérdida de efectividad de estos y, por consiguiente, con el aumento de la resistencia de las plagas a este tipo de productos (Damalas y Eleftherohorinos, 2011).

La combinación por tanto de la insostenibilidad económica, sanitaria y ambiental de los plaguicidas sintéticos empleados en la agricultura convencional ha potenciado la búsqueda de nuevas estrategias que mejoren la productividad y calidad de los cultivos.

El control biológico de plagas y patógenos de las plantas se ha revelado como una opción prometedora en el desarrollo de enfoques de gestión sostenibles, ecológicos y de bajo coste de sistemas agrícolas. Entre estos agentes de control biológico, los microorganismos constituyen una herramienta importante para el control de las enfermedades de las plantas en un contexto de agricultura sostenible. De esta manera, numerosas investigaciones han demostrado cómo promoviendo las interacciones entre las plantas y microorganismos podemos potenciar el crecimiento de estas o su tolerancia al estrés biótico y abiótico, y se ha comprobado cómo contribuyen positivamente a su nutrición y a la disminución

de los patógenos vegetales (Timmusk *et al.*, 2017). Así, podemos definir los biofertilizantes microbianos como productos que contienen primordialmente microorganismos beneficiosos que poseen la capacidad de mejorar la fertilidad del suelo y la productividad de los cultivos (Atieno *et al.*, 2020); estos incluyen las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR), los hongos micorrícicos (Banayo *et al.*, 2012), o los microorganismos fijadores de nitrógeno, como *Rhizobium* spp., entre otros (Alam, 2000). Por otro lado, los biopesticidas, también conocidos como agentes de biocontrol, pueden definirse como ciertos tipos de pesticidas derivados de materiales naturales como animales, plantas, microorganismos o minerales, que protegen a la planta de enfermedades (EPA, 2016). Se dividen en tres clases de compuestos: (i) plaguicidas microbianos, ii) plaguicidas incorporados a las plantas (PIP), sustancias plaguicidas que las plantas producen a partir de material genético que se ha incorporado, y iii) plaguicidas bioquímicos, sustancias de origen natural que controlan las plagas mediante mecanismos no tóxicos.

Este mismo organismo sostiene que los biopesticidas microbianos suponen una alternativa muy interesante y sostenible de control de plagas, presentando una serie de ventajas sobre los convencionales, como una menor toxicidad, mayor especificidad, atacando solo a la plaga objetivo (lo cual pone menos en peligro a la biodiversidad) y mayor efectividad, reduciendo por tanto las dosis requeridas. Sin embargo, el éxito en la utilización de bioplaguicidas microbianos depende de varios factores, como la especificidad del huésped, el hábitat, o de la susceptibilidad a las variables ambientales.

En este contexto, el presente trabajo pretende hacer una revisión de la información científica existente acerca del concepto y funcionamiento del control biológico de plagas, centrándonos específicamente en el uso de los microorganismos para hacer frente a este problema que supone un enorme impacto para el rendimiento de los cultivos.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una búsqueda documental online en los servidores de la Biblioteca de la UAH (BUAH) a través



de los apartados catálogo y “recursos-e”; esto ha permitido que se acceda a todo el material publicado disponible y a las distintas bases de datos.

La búsqueda exhaustiva de información se ha realizado en las siguientes bases de datos: PubMed, Web of Science y Scopus. En las búsquedas se han utilizado las siguientes palabras clave y cadenas booleanas en inglés: “biopesticides” and “crops”; “biological” and “control” and “pests”; “pathogens” or “disease” and “plants”, entre otros.

Debido a la gran cantidad de información que se ofrecía, se filtró la búsqueda por: (1) tema y contenido apropiado al objetivo del trabajo, (2) año de publicación (1985-2021), e (3) idioma de publicación en inglés y español. De todos los artículos que se seleccionaron en base a los requisitos mencionados, se han empleado 162 publicaciones, las cuales se recogen en la lista de referencias proporcionada en la memoria.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1. TÉCNICAS DE CONTROL DE PLAGAS**

##### **3.1.1. Métodos convencionales**

A lo largo de la historia se han desarrollado numerosos métodos convencionales para el control de plagas. Una de estas prácticas es el control físico, alternativa en la cual, o bien el área del que dispone la plaga se altera (mediante sistemas mecánicos, térmicos o electromagnéticos), produciendo niveles de estrés que abarcan desde la agitación hasta la muerte del organismo plaga; o bien, se emplean barreras físicas de protección para las plantas, que delimitan el área y restringen el movimiento de los organismos plaga (Vincent *et al.*, 2003).

Otras prácticas agrícolas tradicionales como la rotación de cultivos, basada en el cambio del tipo de cultivo de un terreno específico de un año a otro mediante variaciones cíclicas o acíclicas, pueden también contribuir eficazmente al control de plagas (Mohler, 2009). De este modo, se evita la acumulación de patógenos específicos de ciertas familias de plantas mediante la alternancia con un huésped que resulta ser incompatible. Estas estrategias suponen, por tanto, la introducción de cultivos intermedios que contribuyen a evitar la erosión, y a potenciar la fertilidad al absorber los nutrientes liberados por el cultivo anterior (Simoes *et al.*, 2014; Kollas *et al.*, 2015). No obstante, presenta el inconveniente

de ser un método económicamente inviable cuando el cultivo de rotación no tiene un valor económico elevado (Newitt *et al.*, 2019).

Otro método de control de plagas es la modificación de poblaciones hospedadoras para la obtención de variedades resistentes que se adapten a las distintas regiones con niveles suficientes de tolerancia y resistencia duradera. Esta técnica clásica de mejora vegetal consiste en la mejora genética sistemática, para elegir aquellas variedades con mayor nivel de resistencia a patógenos de la misma especie o género (Rahman *et al.*, 2018). Es una alternativa más económica que el empleo de plaguicidas convencionales. Sin embargo, en muchas ocasiones han aparecido problemas de resistencia de las nuevas variedades a los pocos años de su liberación, debido a mutaciones de los patógenos, eventos de recombinación sexual y asexual, problemas de uniformidad genética de las variedades y disminución de la resistencia en el campo (Rahman *et al.*, 2018).

### **3.1.2. Pesticidas químicos**

Son todas aquellas sustancias sintéticas empleadas para prevenir, repeler y destruir plagas y comprenden compuestos insecticidas, fungicidas, herbicidas, raticidas, molusquidas, nematocidas, así como reguladores del crecimiento, entre otros (Weiss *et al.*, 2004; Aktar *et al.*, 2009). Están formados por lo que se conoce como agentes “activos” e “inertes”, siendo los primeros los que previenen y destruyen la plaga en sí, y los segundos los que simplemente intervienen en el rendimiento del producto (EPA, 2016). Entre ellos, los más empleados son los herbicidas, fungicidas e insecticidas, siendo la aplicación media de unos 6,0-6,5 Kg/Ha de pesticidas y suelo según un estudio de la FAO en 2013.

No fue hasta el siglo XX cuando se produjeron los primeros insecticidas sintéticos, desbancando a los compuestos botánicos que se estaban utilizando hasta el momento, al ser más efectivos y persistentes. En la Segunda Guerra Mundial se desarrolló uno de los insecticidas organoclorados más conocidos, el DDT, y entre el período de 1945-1970 se emplearon compuestos como piretrinas, la nicotina y la rotenona, sobre todo para uso doméstico y pequeños huertos familiares (Henn y Weinzierl, 1989).

El glifosato, comercializado por primera vez en 1974, es el herbicida utilizado por excelencia a nivel mundial, siendo en los últimos 40 años uno de los que suscitan mayor preocupación e interés de investigación (Duke y Powles, 2008; Duke, 2017). Se trata de un biocida cuya actividad es de amplio espectro y que es absorbido por el follaje de plantas provocando la muerte de estas pasado un tiempo (Van Bruggen *et al.*, 2018). En el caso de los fungicidas, las salmueras y otros productos como el caldo bordelés, fueron desplazados por compuestos sintéticos; en 1966, aparecieron las estrobirulinas que tienen actualmente una gran importancia comercial (Bartlett *et al.*, 2002; Morton y Staub, 2008). En cuanto a los insecticidas, uno de los grupos más utilizados, pueden clasificarse según su composición química en organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides. En la Tabla 1 (Anexo I) se muestran los distintos mecanismos de acción que presenta cada uno de ellos, así como distintos ejemplos de productos comerciales (Weiss *et al.*, 2004).

Los pesticidas químicos son de gran ayuda porque aseguran la disponibilidad de alimentos contribuyendo a disminuir las enfermedades vegetales y vectores (Aktar *et al.*, 2009). No obstante, también suponen un impacto negativo sobre el ambiente y la salud humana, así como mayores costes de producción agrícola (Weiss *et al.*, 2004). Muchos de estos compuestos, ampliamente distribuidos, persistentes y bioacumulables, pueden contaminar no solo suelos agrícolas sino también el aire, masas de agua dulce (como ríos o lagos), mares y océanos (Figura 1, Anexo II), afectando tanto a la biota de estos sistemas, como a insectos beneficiosos o plantas no objetivo (Hurley *et al.*, 1998; Aktar *et al.*, 2009). Ello tendría como efecto una potencial disminución de organismos que pudiesen ser enemigos naturales de las plagas, o ser letales para insectos y microorganismos beneficiosos, aumentando la posibilidad de que se generen resistencias a los productos utilizados (Damalas y Eleftherohorinos, 2011). Por ejemplo, se ha descrito que el uso de los herbicidas Oryzalin y Trifluralin inhibe el crecimiento de algunos hongos micorrícicos que ayudan a la absorción de nutrientes en las raíces de las plantas, o que el Triclopyr, un herbicida común para jardines inhibe a las bacterias oxidantes del amonio (Rahman *et al.*, 2018).

### **3.1.3. Biopesticidas**

Los numerosos inconvenientes que implica el empleo de pesticidas químicos que acabamos de señalar, impulsaron la idea de emplear componentes naturales para la protección de los cultivos; el posible detonante fue la publicación del libro “Silent Spring” (Carson, 1962), momento en el que se empezaron a prohibir insecticidas como el famoso DDT y otra serie de organoclorados (McKinlay *et al.*, 2012). Así, a partir de la década de los 90 se hizo notable el interés por la investigación acerca de insecticidas de origen natural, desarrollando lo que hoy conocemos como biopesticidas (Singh y Adak, 2014).

Los biopesticidas, o agentes de biocontrol, son plaguicidas procedentes de componentes naturales de animales, plantas, microorganismos y algunos minerales. De manera general, se producen, formulan, envasan y venden como productos de bioprotección, bajo una serie de requerimientos de las autoridades correspondientes en forma de pulverizador, empapamiento o recubrimiento de semillas o gránulos (Glare *et al.*, 2012). Tienen la ventaja de ser menos dañinos con respecto a los plaguicidas químicos, y gracias a su especificidad atacan solo a las plagas objetivo y organismos muy relacionados filogenéticamente. Son además eficaces en pequeñas dosis y no dejan residuos dañinos gracias a su rápida degradación, lo que disminuye enormemente su impacto ambiental (Alam, 2000).

## **3.2. TIPOS DE BIOPESTICIDAS**

Dentro de estos productos, podemos diferenciar entre los plaguicidas bioquímicos, los protectores incorporados en las plantas (PIP) y los microbianos.

### **3.2.1. Bioquímicos**

Se definen como pesticidas bioquímicos aquellos compuestos semioquímicos, hormonas, extractos de plantas, enzimas, disuasores de la alimentación, repelentes, agentes de confusión y reguladores del crecimiento que interfieren en el crecimiento y/o apareamiento de los organismos plaga, y que son capaces de atraer y/o repeler a los mismos (Sarwar, 2015).

Así, los semioquímicos son compuestos que emiten las plantas o animales para modificar el comportamiento de organismos receptores y ejercen de señales

permitiendo la comunicación química intra e interespecífica (Mendoza, 1993; Landolt y Phillips, 1997; Norin, 2007). Debido a que el comportamiento de los insectos depende en numerosas ocasiones de la actividad odorífera, mayoritariamente se usan como insecticidas. Tanto las feromonas, que actúan de forma intraespecífica, como los aleloquímicos (alomonas, kairomonas, sinomonas y apneumonas), que actúan a nivel interespecífico, intervienen dirigiendo la alimentación, apareamiento y la puesta de huevos de insectos, y son empleados mediante trampas masivas para la monitorización, interrupción del apareamiento, atracción y muerte de estos enemigos naturales de las plantas, combinando por ejemplo, las feromonas que atraen a los insectos con insecticidas que los matan (Sharma *et al.*, 2019). Los aleloquímicos de plantas (timol o linalol), los compuestos derivados de microorganismos con propiedades insecticidas (estreptomicina o spinosad) o los herbicidas derivados de actinomicetos (bilanofos) se engloban en este grupo (Regnault-Roger, 2020).

Existen otros productos botánicos y naturales que se pueden emplear como biopesticidas bioquímicos. Por ejemplo, se pueden utilizar mezclas de alcaloides como ingrediente activo, como es el caso de los extractos de las plantas *Ryania* o *Sabadilla*, o aceites de romero y clavo, aceite de jojoba, etc. Así, los metabolitos secundarios de plantas se han mostrado eficaces como agentes de biocontrol de insectos para suprimir de forma gradual las infestaciones en zonas donde no son viables otros métodos (Ducrot, 2005; Shafique *et al.*, 2019). Algunos de estos productos que se comercializan son los que se muestran en la Tabla 2 (Anexo I). En la numerosa bibliografía revisada, destaca la azadiractina como producto prometedor para el control de plagas (Campos *et al.*, 2016; Amaral *et al.*, 2019). Se trata de una sustancia odorífera que posee el árbol tropical de neem o *Azadirachta indica*, capaz de inhibir la alimentación, dañar la función hormonal de las etapas juveniles, desregular el crecimiento y producir daños en la reproducción llegando incluso a interrumpir la muda de insectos chupadores y masticadores (Brahmachari, 2004).

Una gran ventaja que posee el empleo de los extractos vegetales es su bajo coste y la baja persistencia en el medio ambiente; no obstante, tiene también poca persistencia contra la plaga objetivo debido muchas veces a la fotodegradación o al lavado de cultivos por la lluvia (Tembo *et al.*, 2018).

### 3.2.2. Protectores Incorporados en Plantas (PIP)

Consiste en la modificación de las poblaciones hospedadoras para potenciar los mecanismos de defensa natural de las plantas contra la infección por patógenos. Así, se entiende por PIP todas aquellas sustancias pesticidas producidas por los vegetales a partir de material genético agregado a la planta que afecta al desarrollo de la plaga o causa su muerte (EPA, 2016; Parker y Sander, 2017).

La primera generación de cultivos transgénicos que contienen PIP data de 1987, e incluyen una o más secuencias de genes de *Bacillus thuringiensis* (Bt) que codifican proteínas Cry insecticidas (toxinas Bt o  $\delta$ -endotoxinas). Estas proteínas resultan tóxicas para lepidópteros, dípteros y coleópteros, de tal manera que cuando estos las ingieren, interactúan en el intestino medio del insecto con los receptores específicos de las células epiteliales, encajándose en la membrana celular y formando poros transmembrana (Barton *et al.*, 1987). Esto produce la parálisis del intestino, de la alimentación, un daño progresivo de las células epiteliales del intestino, y, finalmente, la muerte del organismo plaga (Aronson *et al.*, 1986).

La segunda generación, más recientemente aprobada en 2017 para el gusano de la raíz del maíz, es la de los cultivos que expresan PIP de ARN bicatenario (dsRNA, en sus siglas en inglés) cuyo modo de acción se representa en la Figura 2 (Anexo II) (EPA, 2017; Parker y Sander, 2017). La protección por dsRNA se basa en la interferencia de ARN (iRNA, en sus siglas en inglés), un proceso celular eucariota, altamente conservado y descubierto en 1998 (Fire *et al.*, 1998). En este caso, después de la deglución, el dsRNA es incorporado en una célula diana del organismo plaga; una vez ahí, el dsRNA se fragmenta enzimáticamente en pequeñas moléculas de ARN interferente (siRNA, en sus siglas en inglés). Una de las dos hebras del dúplex de siRNA que se produce, se asocia con proteínas específicas y reconoce el ARN mensajero (mRNA en sus siglas en inglés) complementario para su degradación o inhibición traslacional. Los efectos letales aparecen una vez que se produce la degradación de ese mRNA porque se interrumpe la traducción de proteínas esenciales para el organismo plaga (Parker y Sander, 2017).

De manera análoga, las plantas pueden usar este mecanismo para protegerse frente a virus patógenos. Los virus de las plantas que tienen un genoma de ARN o de ADN generan, a través de la replicación o la transcripción, intermediarios de dsRNA que son procesados por las plantas en siRNA, que se dirigen al ARN viral para su degradación. Recientemente, se ha sugerido que el siRNA también está involucrado en la defensa antifúngica, ya que las plantas envían siRNA a los patógenos fúngicos para dirigirse a genes esenciales, como hace el algodón contra *Verticillium dahliae*, Arabidopsis contra *Botrytis cinerea* y el trigo contra *Fusarium graminearum* (Pappas *et al.*, 2020) (Figura 2, Anexo II).

El problema que presentan las plantas modificadas genéticamente es que las variedades suelen tardar décadas en desarrollarse y suponen un coste muy elevado, además de presentar escasa aceptación por los consumidores. Esta práctica está en auge en América y Asia, predominando sobre todo en cultivos de algodón, soja y maíz (ISAAA, 2016). No obstante, la categoría de los PIP no está reconocida por la Unión Europea (UE) como bioplaguicidas debido a su naturaleza de compuestos transgénicos.

### **3.2.3. Microbianos**

Los biopesticidas microbianos son aquellos que provienen de hongos, bacterias, algas, protozoos, así como metabolitos microbianos (Van Lenteren, 2012). Los micovirus y bacteriófagos también pueden ser empleados como microorganismos de control contra patógenos vegetales (Köhl *et al.*, 2019). En ocasiones puede considerarse que engloba a microorganismos que pueden eliminar o controlar patógenos de plantas, y alternativamente, a microorganismos beneficiosos que pueden ser útiles para mantener la salud de los cultivos bajo presiones medias o bajas de plagas (Rahman *et al.*, 2018).

Esta estrategia presenta numerosas ventajas pues los agentes bioactivos no son tóxicos o patógenos para los seres humanos ni para comunidades no objetivo; así, su área de acción es reducida y específica de un solo grupo o especie de plagas, por lo que los insectos beneficiosos no resultan dañados en las áreas a tratar. Los pesticidas microbianos pueden emplearse combinándolos con los sintéticos porque normalmente estos no se desactivan, y los residuos que generan no resultan tóxicos o dañinos para humanos o animales, de forma que

estos productos pueden emplearse en tiempo de cosecha. Estos productos son preparados comerciales que contienen microorganismos vivos a los que en algunos casos se añaden metabolitos microbianos, y productos que sólo poseen metabolitos microbianos sin células vivas antagonistas (Glare *et al.*, 2012).

Desde el punto de vista legal, se consideran compuestos activos; en Australia, Brasil, Canadá, Europa, Japón, Nueva Zelanda y Estados Unidos se registraron en 2017 un total de 101 Microbiological Control Agents (MBCAs, en sus siglas en inglés) para el control de enfermedades (Van Lenteren *et al.*, 2018). Sin embargo, pese a haber alcanzado un alto nivel de confianza, es necesario establecer inequívocamente el modo de acción y las características intrínsecas de este tipo de productos (Nawaz *et al.*, 2016). A continuación, en los apartados siguientes se describirá con mayor profundidad los principales microorganismos implicados y mecanismos de acción de los biopesticidas microbianos.

### **3.3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE BIOPESTICIDAS MICROBIANOS**

Entre las interacciones que pueden establecer los microorganismos y las plantas involucradas en el control de plagas, encontramos el mutualismo, sinergismo, comensalismo, neutralismo, competencia, amensalismo, parasitismo y depredación (Pal y McSpadden Gardener, 2006; Rahman *et al.*, 2018).

Las relaciones sinérgicas o mutualistas entre planta-microorganismo (microorganismos rizosféricos, filosféricos, endófitos, etc.) potencian los efectos supresores de las enfermedades y estimula el crecimiento de la planta, que aprovecha de forma más eficiente los nutrientes (Cano, 2011). Así, por ejemplo, las PGPR no solo incrementan la disponibilidad de nutrientes para las plantas, sino que también pueden actuar como agentes de biocontrol mediante la competencia por un nicho/sustrato ecológico, la producción de aleloquímicos inhibidores, o la inducción de resistencia sistémica (ISR) en plantas hospedadoras a un amplio espectro de patógenos, como detallaremos a continuación (Olanrewaju *et al.*, 2017; Numan *et al.*, 2018).

No obstante, tradicionalmente se ha prestado especial interés al amensalismo, la competencia, el parasitismo y la depredación para el control biológico de plagas.



### 3.3.1. Amensalismo

Es una interacción en la que una especie resulta dañada o inhibida, debido a la producción por parte de una segunda población de una sustancia o toxina que inhibe su crecimiento, mientras que esta segunda población, o no se muestra afectada o se favorece (Qureshi y Michaud, 2005; Ginovart *et al.*, 2019). Las sustancias tóxicas producidas incluyen los antibióticos (antibiosis), compuestos orgánicos volátiles y toxinas, o enzimas que degradan las paredes de hongos patógenos, como la quitinasa (Vero, 2006; Rahman *et al.*, 2018).

Los antibióticos son sustancias de bajo peso molecular producto del metabolismo secundario de los microorganismos antagonistas, que inhiben el crecimiento o producen la muerte del patógeno (Vero, 2006). Son sintetizados y liberados al medio ambiente en pequeñas cantidades por muchos microorganismos. La generación de metabolitos antimicrobianos involucrados en el biocontrol de plagas se ha descrito en bacterias pertenecientes a *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, y muchos otros géneros (Regnault-Roger, 2020). Por ejemplo, el género *Pseudomonas* presenta especies productoras de metabolitos antifúngicos, como las fenazinas, la pyrrolnitrina, el 2,4-diacetilcloroglucinol (DAPG) y pyoluteorina. Estos antibióticos son los producidos, por ejemplo, por *Pseudomonas fluorescens* para el control del patógeno *Pythium ultimum* en cultivos de *Lotus corniculatus*, *Sclerotium rolfsii* en porotos y *Rhizoctonia solani* en tomate (De la Fuente *et al.*, 2004). Otras bacterias propias de la rizosfera contienen también cepas productoras de antibióticos, como es el caso de *Bacillus* ssp., que produce especialmente lipopéptidos como iturina A, surfactina y fengicina, o *Agrobacterium radiobacter*, que produce agrocina 84 para eliminar las cepas patógenas de *Agrobacterium tumefaciens* y controlar las infecciones de agallas de corona (Kim *et al.*, 2006; Rahman *et al.*, 2018).

En cuanto a los hongos, los más empleados como agentes productores de antibióticos en el control de hongos fitopatógenos son los géneros *Trichoderma* y *Gliocladium*; el primero destaca por producir antibióticos como la gliotoxina y la gliovirina, así como antibióticos peptídicos capaces de alterar la permeabilidad iónica de la membrana celular del patógeno (Vero, 2006). Algunos agentes de biocontrol como el hongo filamentoso *Purpureocillium lilacinum*, son capaces de

producir leucinostatinas, antibiótico de actividad antiviral, antibacteriana, antifúngica, antitumoral y fototóxica, para el control biológico de fitopatógenos como *Phytophthora infestans* y *P. capsici* (Wang *et al.*, 2016). En el caso de los hongos endófitos, también producen metabolitos secundarios de carácter antifúngico, antibacteriano e insecticida para detener el crecimiento de patógenos vegetales (Gunatilaka, 2006). Esto ocurre en *Cryptosporiopsis quercine*, hongo endófito que produce criptocina, un ácido tetrámico con propiedades antifúngicas inhibitoras de hongos patógenos como *Pyricularia oryzae*, causante de la enfermedad de la explosión del arroz (Li *et al.*, 2000). El amensalismo en el caso de los hongos ectomicorrícicos supone la síntesis de antibióticos, compuestos volátiles y no volátiles y enzimas degradadores de la pared celular de los hongos patógenos (Vero, 2006).

### **3.3.2. Competencia**

La competencia es una relación negativa que deriva en una reducción del crecimiento, actividad y/o fecundidad de los organismos que interactúan, debido a una demanda simultánea de los recursos en un determinado microambiente (Droby y Chalutz, 1994; Pal y McSpadden Gardener, 2006). Para que la competencia ocurra es primordial que haya escasez de algún elemento, como el espacio físico, luz, oxígeno o nutrientes. En el contexto de control biológico, la población no patógena tendrá que colonizar de forma más rápida el sitio de acción y tener una capacidad más eficiente de empleo de los nutrientes a bajas concentraciones (Vero, 2006).

La competencia por los nutrientes es la más estudiada en los últimos años, y puede producirse por la fuente de carbono, nitrógeno y otros oligoelementos como el hierro. Un ejemplo de competencia por carbono es la que se establece entre los hongos de *Fusarium oxysporum*, donde el mayor desarrollo de los aislados saprófitos fúngicos inhibe el desarrollo de los aislados patógenos (Rubio y Fereres, 2005). En el caso del hierro, cuando un microorganismo se encuentra bajo condiciones escasas de este elemento, puede producir sideróforos, es decir, moléculas de bajo peso molecular capaces de quelar el ion férrico y transportarlo al interior de la célula. Por tanto, la solubilización y la adquisición por competición de este oligoelemento en condiciones limitantes restringirá el desarrollo de otros habitantes, entre ellos, organismos patógenos (Vero, 2006;

Rahman *et al.*, 2018). En especial, las bacterias del género *Pseudomonas* destacan por producir sideróforos que se clasifican como pioverdinas o pseudobactinas; al secretarse estos en condiciones limitantes de hierro, el complejo sideróforo-hierro está disponible para la célula que lo incorpora mediante un receptor presente en su membrana externa (O' Sullivan y O' Gara, 1992). Este mecanismo es responsable, por ejemplo, del control de fitopatógenos del frijol como *Colletotrichum lindemuthianum* (Santoyo *et al.*, 2010) o *Fusarium oxysporum* (Elad y Baker, 1985).

Para el caso de las asociaciones micorrícicas arbusculares (MA), el carbono parece ser el oligoelemento limitante por el cual surge la competencia entre estas y los patógenos coexistentes (Vos *et al.*, 2014). Al convivir con ciertos patógenos, los hongos MA también pueden competir por el espacio, y por tanto limitar el desarrollo de estos, mediante modificaciones fisiológicas y anatómicas del huésped, tales como el engrosamiento de la pared celular o la lignificación de la masa de la raíz. Para protegerse frente a los patógenos de las raíces, los hongos ectomicorrízicos ponen en marcha un mecanismo donde se establece una barrera física en el interior (red Hartig) y alrededor (manto hifal) de las raíces (Ghorbanpour *et al.*, 2018).

### **3.3.3. Parasitismo**

En este caso el parásito, generalmente el microorganismo más pequeño, es el que se favorece del huésped, el cual resulta perjudicado (Pal y McSpadden Gardener, 2006).

Un tipo específico de parasitismo, y de especial relevancia en el control microbiológico de plagas es el micoparasitismo, donde un hongo ejerce un efecto negativo sobre otro patógeno de manera directa, es decir, mediante la destrucción de estructuras y el aprovechamiento de los nutrientes del huésped (Van Gelderen, 2009). Los principales microorganismos empleados en esta estrategia son los géneros *Trichoderma* y *Gliocladium*, y otro tipo de hongos no filamentosos como *Pichia guilhermondii* (Wisniewski *et al.*, 1991). Así, *Trichoderma barzianum* y *T. bamatum* limitan el desarrollo de patógenos como *Botrytis cinérea*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani* (Atlas y Bartha, 2002). Este proceso comienza con un evento conocido como quimiotropismo, donde el

parásito crece en dirección al patógeno debido a una estimulación química. A continuación, después del reconocimiento específico entre el huésped y el micoparásito, se produce el enrollamiento de las hifas de *Trichoderma* con las del patógeno, penetrando en la célula huésped para formar ganchos y apresorios. Se produce entonces la lisis de la pared celular del huésped por la secreción de una serie de enzimas, como las endoquitinasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas y proteasas (Vero, 2006; Bruce *et al.*, 1995); así mismo, las hifas del hongo micoparásito secretan antibióticos que empapan las hifas afectadas del huésped, impidiendo la resíntesis de la pared celular, es decir, se produce la combinación de antibiosis y micoparasitismo (Toghueo *et al.*, 2016). Otro ejemplo es el control que ejerce el basidiomiceto *Laetisaria arvalis* sobre *Pythium ultimum* y *R. solani* mediante la producción de ácido 8-hidroxilinoico para la inducción de la lisis de estos hongos patógenos (Atlas y Bartha, 2002).

Los virus también pueden establecer relaciones de parasitismo con patógenos de plantas. Los micovirus y bacteriófagos, son virus que atacan específicamente a hongos y bacterias patógenas de plantas, respectivamente. Por ejemplo, los bacteriófagos pueden emplearse en el control de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* o *Erwinia amylovora*, que afecta a manzanas y peras (Gayder *et al.*, 2020). Así mismo, se han descrito numerosos ejemplos de virus con actividad insecticida que también pueden ser una interesante opción en el control de plagas (Köhl *et al.*, 2019); este aspecto se tratará con mayor profundidad en apartados posteriores de esta memoria.

#### **3.3.4. Depredación**

A nivel microbiano, existe una línea muy fina entre parasitismo y depredación, sin que la distinción entre ambas sea muy clara. La depredación ocurre cuando un organismo normalmente de mayor tamaño, el depredador, engulle y digiere al otro organismo, la presa, con el cual mantiene una interacción de corta duración. Este tipo de interacción puede suponer un método efectivo de biocontrol (Köhl *et al.*, 2019). Por ejemplo, es posible emplear cepas de la bacteria *Bdellovibrio bacteriovorus* en la depredación de bacterias fitopatógenas como *Agrobacterium tumefaciens* o *Xanthomonas vesicatoria*, entre otras (McNeely *et al.*, 2017).

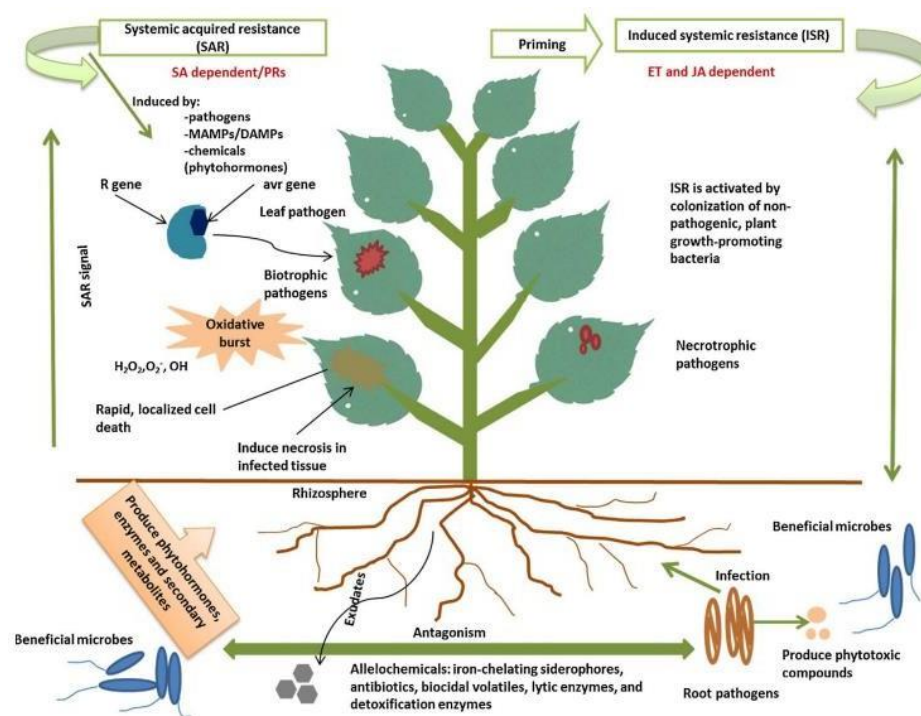
Otros microorganismos que emplean este tipo de interacción para actuar como bioplaguicidas de insectos y nematodos son los hongos. Así, los hongos nematófagos, que se clasifican en ovicidas, endoparásitos y depredadores, son un tipo de hongos capaces de atrapar y digerir las formas libres de los nematodos en el suelo (Larsen, 1999). Estos hongos depredadores son saprófitos formadores de un sistema de micelios extensivo que emplean como fuente de nutrientes las fases de vida libre de los nematodos. Su mecanismo de acción es variado y comprende desde la producción de un material adhesivo sobre las hifas, hasta la formación de complejos anillos constrictores (Sagüés *et al.*, 2011). Estos combinan movimientos mecánicos mediante estructuras de captura, y la liberación de enzimas hidrolíticas extracelulares, de tal manera que, después de la penetración, el hongo forma un bulbo infectivo en el interior del nematodo para infectarlo completamente pasadas las horas (Shepherd, 1995). Los géneros más empleados son *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactylella* y *Monacrosporium*.

### **3.3.5. Inducción de resistencia**

La resistencia se entiende como la aptitud que tiene la planta para exponerse de forma completa o parcial a la acción de un patógeno, y se puede clasificar en resistencia constitutiva, propia de la planta, o resistencia inducida, si sólo se activa ante ciertos estímulos (Vero, 2006). En el contexto de esta memoria, es de interés la resistencia inducida, que implica un estado de “capacidad defensiva mejorada” resultante de estímulos ambientales específicos (Choudhary *et al.*, 2007). Los mecanismos implicados son la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (ISR) (Figura 2); ambas difieren en el inductor, tipo de respuesta y señal reguladora del mecanismo de resistencia (Hammerschmidt, 1999).

La SAR es una resistencia que se produce localmente, o de forma sistémica, como respuesta a la interacción con un patógeno que causa una lesión necrótica (resultado de una infección exitosa o debido a una respuesta hipersensible), o a la presencia de sustancias químicas naturales o sintéticas (Hammerschmidt, 1999; Vero, 2006). En este proceso se acumulan proteínas asociadas con la patogénesis, conocidas como PRP, donde destacan las quitinasas, proteasas o glucanasas, y es un proceso mediado por el ácido salicílico (Choudhary *et al.*, 2007).

Por su parte, la ISR, también denominada inicialmente como cebado, fue descrita por primera vez por Van Peer *et al.* en 1991. Está mediada por la presencia de PGPR, y, al contrario que SAR, no acumula las PRP ni está mediada por el ácido salicílico, sino que las vías están reguladas por el jasmonato y el etileno (Compant *et al.*, 2005). De esta forma, el mayor estado de alerta inducido por las bacterias beneficiosas permite que la planta responda más rápido y con más fuerza contra los posteriores ataques de patógenos; es decir, las rizobacterias no patógenas son capaces de activar los mecanismos de defensa en las plantas, incluyendo el refuerzo de las paredes celulares, la producción de fitoalexinas, o estimulando la ISR (Conrath *et al.*, 2002).



**Figura 2:** Esquema de los sistemas de resistencia en plantas (Rahman *et al.*, 2018)

Cuando se inoculan con rizobacterias, las plantas que poseen ISR muestran una activación más fuerte y/o más rápida de los mecanismos de defensa después de un ataque posterior de un patógeno o como respuesta al estrés abiótico (Pieterse *et al.*, 2014). Algunos estudios revelaron que para que se active este sistema debe ocurrir una interacción planta-bacteria regulada por sideróforos o por lipopolisacáridos de origen bacteriano inductor (Ramamoorthy *et al.*, 2001). Así, por ejemplo, se ha descrito que varias cepas de *Pseudomonas* inducen ISR en clavel, pepino, rábano, tabaco y *Arabidopsis*, donde la cadena lateral O-antigénica del lipopolisacárido de la membrana externa bacteriana parece actuar

como un inductor determinante junto con otros rasgos bacterianos (Choudhary *et al.*, 2007). También se ha descrito cómo la colonización de las raíces por el hongo beneficioso *Piriformospora indica* prepara sistemáticamente a la cebada incrementando su tolerancia frente al estrés biótico y abiótico (Rai *et al.*, 2001).

### **3.4. PRINCIPALES MICROORGANISMOS USADOS COMO AGENTES DE BIOCONTROL**

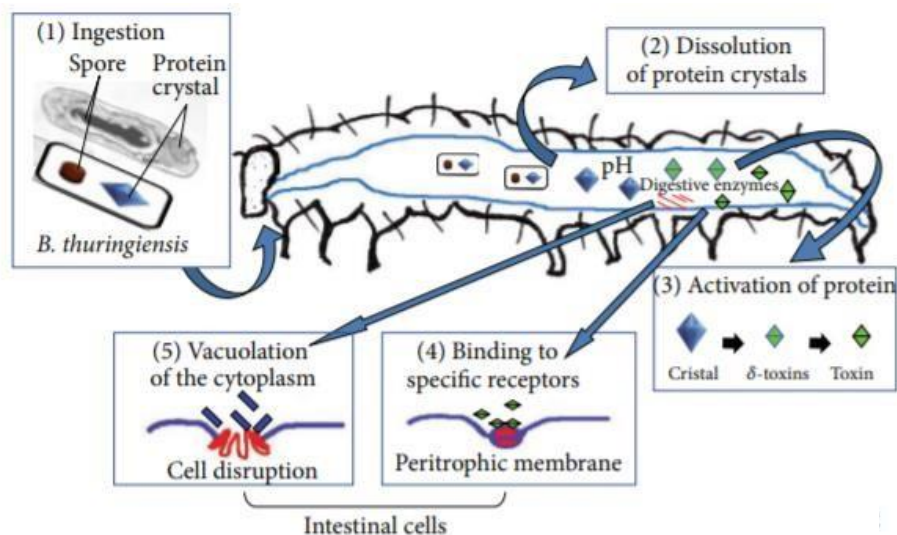
Para el control microbiológico de plagas se emplean sobre todo bacterias, hongos y virus (Arthurs *et al.*, 2019), y, primordialmente, como insecticidas microbianos. Por ello en este trabajo nos centraremos en los principales agentes de control microbiológico utilizados como entomopatógenos.

#### **3.4.1. Bacterias**

Las bacterias entomopatógenas son aquellas que poseen la habilidad de penetrar en el huésped evadiendo sus defensas para multiplicarse y propagarse, causando así la enfermedad debido a la producción de toxinas y enzimas (Grijalba *et al.*, 2018). Los metabolitos bacterianos se producen de forma industrial en biofermentadores y están frecuentemente elaborados a base de una mezcla de esporas, proteínas cristalinas y portadores inertes (Sanahuja *et al.*, 2011). Las bacterias entomopatógenas son de gran éxito para el control de plagas, siendo más frecuente el uso de bacterias grampositivas, ya que presentan mayor estabilidad en el tiempo en comparación con las gramnegativas (Glare *et al.*, 2017).

La bacteria más estudiada y empleada en este caso es *B. thuringiensis* (Bt), una bacteria ubicua, grampositiva, que en su forma vegetativa resulta poco tóxica para los insectos pero que, en la esporulación produce una toxina proteica intracelular cristalizada, conocida como el cuerpo paraesporal, que actúa como insecticida bacteriano sobre todo de larvas de lepidópteros (Palma *et al.*, 2014). Ese cuerpo paraesporal o inclusión paracristalina que se deposita en el esporangio pero fuera de la propia endospora, está formado por polipéptidos de entre 130 y 250 kDa, conocidos como protoxinas ( $\delta$ -endotoxinas o proteínas Cry). Cuando el intestino de los insectos posee condiciones alcalinas, el cristal paraesporal ingerido libera la protoxina, y las proteasas alcalinas la escinden para dar lugar a la proteína tóxica activa de entre 30 y 80 kDa. A continuación,

seis de las unidades de la toxina activa se enlazan con las membranas del epitelio del intestino de la larva para modificar la osmorregulación y alterar el flujo de iones  $K^+$ , provocando finalmente la lisis de la célula (Figura 3) (Atlas y Bartha, 2002; Prescott *et al.*, 2004).



**Figura 3:** Mecanismo de acción de Bt (Schünemann *et al.*, 2012)

Así, los productos basados en cepas de Bt que contienen sólidos de fermentación, esporas o toxinas Cry, se encuentran entre los bioplaguicidas más producidos, con un historial de seguridad sin precedentes (Raymond y Federici, 2017). Las toxinas Cry son específicas para cada especie de insecto; se comercializan actualmente al menos cinco cepas de *Bt kurstaki* y dos de *Bt aizawai*, así como *Bt israeliensis* o *Bt subtilis* para el control de las principales plagas de orugas, en brásicas, árboles frutales, algodón, hortalizas, plantas ornamentales y muchos otros cultivos comerciales (Arthurs y Dara, 2019; Domínguez-Arrizabalaga *et al.*, 2020).

Como se ha comentado con anterioridad, se pueden emplear además técnicas moleculares que permiten incorporar los genes que codifican los cristales proteicos (Cry) en especies de plantas transgénicas, o en microorganismos de la rizosfera, para brindar mayor protección a la planta frente a los insectos parásitos (Lacey *et al.*, 2015).

Otro tipo de bacterias grampositivas empleadas son *Lysinibacillus sphaericus* o *Paenibacillus popilliae* para el control del escarabajo en *P. japonica* (Arthurs y Dara, 2019) y, en menor medida bacterias gramnegativas como *Serratia* sp. En



concreto, se han descrito varias *Proteobacterias* con propiedades insecticidas que han generado interés comercial (Ruii, 2015). Dos especies de la clase *Betaproteobacteria* (*Burkholderia rinojensis* y *Chromobacterium subtsugae*) se han desarrollado como bioinsecticidas, nematocidas y acaricidas y se registran para el control de plagas en frutas, verduras, frutos secos, césped y plantas ornamentales (Martin *et al.*, 2007; Ruii, 2015). Se ha observado que producen múltiples efectos subletales en el hospedador por contacto e ingestión, como la reducción de la alimentación, la fecundidad y comportamientos de oviposición (Cordova-Kreylos *et al.*, 2013).

### **3.4.2. Hongos**

Son de gran ayuda ya que su acción de contacto, así como su capacidad para romper la cutícula directamente, hacen que sean los agentes microbianos capaces de atacar a la mayoría de las plagas cuyo alimento es la savia (Arthurs y Dara, 2019). Los hongos entomopatógenos son causantes de infecciones mortales y regulan la población de insectos y ácaros por epizootias, con un riesgo muy bajo de atacar organismos no objetivo o insectos beneficiosos (Shahid *et al.*, 2012).

Su modo de acción contra lepidópteros y pulgones, entre otros, comienza con una unión de los conidios, es decir, las esporas, a la cutícula del insecto mediante mucílagos (Hajek y Leger, 1994). Si las condiciones lo permiten, pueden germinar las esporas para formar apresorios (Wang y Wang, 2017) y se hidroliza la epidermis del insecto mediante lipasas, proteasas y quitinasas (Shahid *et al.*, 2012). La penetración posterior se consigue gracias a la combinación de acciones mecánicas y enzimáticas; los hongos penetran después en el hemocelo del lepidóptero para obtener nutrientes, segregando toxinas que dañan las células y finalmente matan al huésped (Qu y Wang, 2018). Tras la muerte del hospedador, los conidióforos salen del cadáver para producir nuevamente conidios infecciosos, para la diseminación y continuación del ciclo de vida del hongo (Mascarín y Jaronski, 2016).

Los cuatro géneros más estudiados son *Beauveria*, *Metarrhizium*, *Entomophthora* y *Coelomomyces*. *Beauveria bassiana* que puede ser empleado en combinación con pesticidas químicos, es de ayuda para controlar el barrenado

de la manzana y las peras, *Cydia pomonella*, y la plaga de las orugas del maíz. *Metarhizium anisoplia* se usa en el control del escarabajo de la patata de Colorado y de la candelilla de la caña de azúcar, mientras que *Entomophthora* spp. es un agente prometedor para el control de áfidos.

Hoy en día los hongos entomopatógenos endofíticos (EEPF) generan gran interés como prometedores agentes de control biológico debido a su peculiar estilo de vida (endófitos asintomáticos de las plantas e infecciosos para los insectos herbívoros). En general, su endofitismo ofrece una ventaja en comparación con los hongos entomopatógenos utilizados como agentes de control biológico de contacto, cuya eficacia está limitada en muchos casos por su susceptibilidad a distintos factores bióticos y abióticos. Sin embargo, los mecanismos que subyacen sus interacciones con las plantas y los organismos plaga siguen siendo poco conocidos. En particular, las últimas investigaciones se han centrado en el papel de los EEPF en la producción de metabolitos secundarios, así como en su capacidad de promover el crecimiento de las plantas y mejorar su resistencia (Pappas *et al.*, 2020).

### **3.4.3. Virus**

Los virus patógenos de insectos provocan epizootias naturales, y pertenecen a las familias *Baculoviridae*, *Poxviridae*, *Iridoviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae* y *Rhabdoviridae*; los más estudiados para el control de plagas son los baculovirus porque infectan y matan a las células de los insectos que lo ingieren (Atlas y Bartha, 2002). Estos tienen un tamaño muy pequeño, de entre 80 y 180 kpb, y están formados por ADN de doble hebra, involucrada en la codificación de los genes necesarios para el establecimiento y la reproducción del virus (Mansouri y Berger, 2018; Regnault- Roger, 2020). Los baculovirus producidos *in vivo* a partir de cuerpos de oclusión viral se han utilizado durante muchos años, pero su mercado está siendo potenciado recientemente (Arthurs y Dara, 2019).

Al igual que Bt, los baculovirus necesitan ser ingeridos por el hospedador para causar mortalidad, pero son más específicos en comparación con Bt en plagas de lepidópteros (Grzywacz, 2016), aunque, por el contrario, son más caros. La alta especificidad que presentan les proporciona la capacidad de ser buenos insecticidas, no obstante, provoca que tengan estrecho espectro de actividad. Se

emplean en cultivos de hortalizas, tomates, coles, algodón y otra serie de productos, y sus organismos objetivos son la polilla gitana de la madera *Lymantria dispar*, el gusano cogollero de la remolacha *Spodoptera exigua*, el gusano de los cogollos del tabaco *Helicoverpa zea* o *Spodoptera littoralis* (Regnault- Roger, 2020).

Los baculovirus empleados comprenden fundamentalmente los *Nucleopolyhedrovirus* o virus de la poliedrosis nuclear (NPV) y los *Granulovirus* o virus de la granulosis (GV) (Atlas y Bartha, 2002; Arthurs y Dara, 2019). Las hojas de las plantas de las que se alimentan los insectos son inoculadas con NPV, activándose la epizootia que reduce la población de la plaga de orugas de librea y el totrix de la picea, entre otros (Atlas y Bartha, 2002). De los más de 125 tipos de NPV, el 90 % daña a lepidópteros y son utilizados como concentrado líquido en cultivos de campo e invernaderos, y pueden ser empleados en combinación con otros parasitoides y con otros métodos de control biológico (Raymond *et al.*, 2006; Madigan *et al.*, 2015). La mayoría de las formulaciones de NPV son estables durante un año o más en refrigeración, aunque tienen una actividad residual limitada (vidas medias de unos pocos días) en condiciones de campo. En cuanto a GV, aproximadamente el 50 % es empleado en el control de la polilla india de la harina o en la polilla de la manzana *Cydia pomonella*, (Wennmann *et al.*, 2021). Específicamente, el granulovirus de la polilla de la manzana (CpGV-M), para la protección de manzanas y otras frutas de pepita, es uno de los baculovirus más utilizados en Estados Unidos con varios productos comercialmente viables, mientras que en Europa la formulación de Carpovirusine se utiliza en 100.000 Ha (Lacey *et al.*, 2008).

### **3.5. DATOS DE MERCADO Y PERSPECTIVAS FUTURAS**

Los plaguicidas microbianos constituyen una parte importante de la industria de los bioplaguicidas siendo los productos de más rápido crecimiento (Figura 3, Anexo II) (Dunham, 2015). Tradicionalmente, los bioplaguicidas han sido producidos por un número limitado de pequeñas industrias para el control de artrópodos en mercados especializados (Lacey *et al.*, 2015). Sin embargo, cada vez más, están siendo adoptados por empresas medianas y grandes y se

comercializan para una gama más amplia de cultivos agrícolas (Pal y McSpadden Gardener, 2006).

La utilización de estas sustancias activas requiere unos conocimientos técnicos especiales, de forma que los problemas tecnológicos que antes frenaban su desarrollo han sido solventados en los últimos años, gracias a las mejoras de acondicionamiento, manipulación y almacenamiento que requieren los organismos o sustancias biológicas, o a la estandarización de los productos acabados. Las empresas han adoptado rigurosos criterios de seguridad impuestos para los fitosanitarios convencionales y elaborado formulaciones más eficaces y estables, que facilitan la aplicación de los productos de biocontrol en los sistemas agrícolas y la realización de las tareas por parte de los operarios (Chandler *et al.*, 2011; Regnault- Roger, 2020).

A nivel mundial, en el año 2010 los pesticidas microbianos alcanzaron unas ventas valoradas en 400 millones de dólares aproximadamente. Así, se espera que el mercado de biopesticidas alcance una tasa de crecimiento de un 3,4 % durante el período 2019-2024, siendo Estados Unidos el que encabeza el mercado seguido de Europa, Asia y Oceanía, Latino América y el continente africano (Glare *et al.*, 2012; Regnault-Roger, 2020). En el año 2017 se registraron en la EPA un total de 356 ingredientes activos de biopesticidas (bioquímicos y microbianos) incluyendo bioinsecticidas, acaricidas, nematocidas, fungicidas, bactericidas, herbicidas, bioquímicos modificadores del comportamiento y promotores de la salud vegetal (EPA, 2017). Entre ellos, hay 125 ingredientes activos basados en especies/cepas microbianas o metabolitos plaguicidas, fundamentalmente dirigidos contra invertebrados, y que comprenden 21 bacterias, 10 hongos y 8 baculovirus (Tabla 3, Anexo I). En España, existen numerosas formulaciones comerciales de distintas cepas de *Bt israeliensis*, *Bt kurstaki*, *Bt subtilis*, así como GV de *Cydia pomonella* y *Pseudomonas*, entre otros (Tabla 4, Anexo I) (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2021).

La gestión de las resistencias de las plagas, la preferencia de los consumidores por los alimentos sin residuos, la seguridad de los organismos polinizadores, la seguridad de los trabajadores agrícolas, las nuevas restricciones a los plaguicidas químicos, así como la disminución del coste de producción de los biopesticidas, contribuirán a impulsar la adopción de esta alternativa sostenible

de control de plagas. De esta manera, se estima que el mercado mundial de bioplaguicidas aumente considerablemente en los próximos años.

El desarrollo futuro de los bioplaguicidas vendrá asociado al mejor conocimiento de los genomas de las plagas y sus enemigos naturales, contribuyendo a que surjan productos más eficientes, por ejemplo, implementando técnicas como la interferencia de ARN (Baum *et al.*, 2007; Aiuchi *et al.*, 2007). La investigación y adopción de nuevos productos necesitará una revisión de las legislaciones vigentes, especialmente en el caso de los cultivos genéticamente modificados (Chandler *et al.*, 2011). Por otro lado, en los últimos años ha habido un aumento de registros de plaguicidas microbianos definido como “bioestimulantes”. Estos productos suelen utilizarse de forma preventiva y deben inocularse antes de la aparición de la plaga. Algunos de los “bioestimulantes” inducen las defensas de las plantas más que dirigirse a patógenos específicos, aunque como hemos señalado, también contribuyen indirectamente a la gestión de las plagas. Es hoy objeto de debate si estos “bioestimulantes” pueden considerarse verdaderos bioplaguicidas y, en caso afirmativo, cómo deberían probarse y registrarse (du Jardin, 2015). Por tanto, son estas áreas de investigación en rápido desarrollo.

#### **4. CONCLUSIONES**

En base a lo expuesto anteriormente, el uso de microorganismos para el control de plagas y enfermedades de los cultivos es un campo prometedor, pero todavía en desarrollo. Actualmente se realizan importantes esfuerzos para la consolidación de estas opciones biológicas y cada vez son más las empresas que aprovechan el conocimiento generado para la formulación y comercialización de productos basados en agentes de biocontrol. Esto es así en base al aumento de cadenas de producción y consumidores que requieren productos más sostenibles y de origen más natural. Esta estrategia contribuirá sin duda a reducir el uso de productos fitosanitarios sintéticos más dañinos, garantizando que la producción agrícola pueda hacer frente a la alta demanda alimentaria existente de manera segura y ambientalmente sostenible; es decir, el cambio de mentalidad y potenciación de este nuevo método de control beneficia no solo al propio agricultor y por tanto consumidor, si no que será un avance en la economía, en la salud humana y en el cuidado del medio ambiente.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

Aiuchi, D., Inami, K., Sugimoto, M., Shinya, R., Tani, M., Kuramochi, K. y Koike, M., 2008. A new method for producing hybrid strains of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* (*lecanicillium* spp.) through protoplast fusion by using nitrate non-utilizing (nit) mutants. *Micología Aplicada Internacional*, 20(1), 1-16.

Aktar, W., Sengupta, D. y Chowdhury, A., 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1-12.

Alam, Ghayur., 2000. A Study of Biopesticides and Biofertilisers in Haryana, India. *International Institute for Enviroment and Development*, 93, 3-20.

Amaral, K., Gandra, L., de Oliveira, M., de Souza, D. y Della Lucia, T., 2019. Effect of azadirachtin on mortality and immune response of leaf-cutting ants. *Ecotoxicology*, 28(10), 1190-1197.

Aronson, A., Beckman, W. y Dunn, P., 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiological Reviews*, 50(1), 1-24.

Arthurs, S. y Dara, S., 2019. Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*, 165, 13-21.

Atieno, M., Herrmann, L., Nguyen, H., Phan, H., Nguyen, N., Srean, P., Than, M., Zhiyong, R., Tittabutr, P., Shutsrirung, A., Bräu, L. y Lesueur, D., 2020. Assessment of biofertilizer use for sustainable agriculture in the Great Mekong Region. *Journal of Environmental Management*, 275, 111300.

Atlas, R. y Bartha, R., 2002. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. 4th ed. Madrid: Pearson Educación, 621-648.

Banayo, N., Cruz, P., Aguilar, E., Badayos, R. y Haefele, S., 2012. Evaluation of Biofertilizers in Irrigated Rice: Effects on Grain Yield at Different Fertilizer Rates. *Agriculture*, 2(1), 73-86.

Bartlett, D., Clough, J., Godwin, J., Hall, A., Hamer, M. y Parr-Dobrzanski, B., 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*, 58(7) 649-662.

Barton, K., Whiteley, H. y Yang, N., 1987. *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -Endotoxin Expressed in Transgenic *Nicotiana tabacum* Provides Resistance to Lepidopteran Insects. *Plant Physiology*, 85(4), 1103-1109.

Baum, J., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T. y Roberts, J., 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, 25(11), 1322-1326.

Brahmachari, G., 2004. Neem-An Omnipotent Plant: A Retrospection. *ChemBioChem*, 5(4), 408-421. Doi: 10.1002/cbic.200300749

Bruce, A., Srinivasan, U., Staines, H. y Highley, T., 1995. Chitinase and laminarinase production in liquid culture by *Trichoderma* spp. and their role in biocontrol of wood decay fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 35, 337-353.

Campos, E., de Oliveira, J., Pascoli, M., de Lima, R. y Fraceto, L., 2016. Neem Oil and Crop Protection: From Now to the Future. *Frontiers in Plant Science*, 7(1494).

Cano, M., 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2), 15-31.

Carson, R., 1962. *Silent spring*. 1st ed. Houghton Mifflin Company.

Carvalho, F., 2017. Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, 6(2), 48-60.

Chandler, D., Bailey, A., Tatchell, G., Davidson, G., Greaves, J. y Grant, W., 2011. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366 (1573), 1987-1998.

Choudhary, D., Prakash, A. y Johri, B., 2007. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47, 289-297.

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. y Barka, E., 2005. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles,

Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951-4959.

Conrath, U., Pieterse, C. y Mauch-Mani, B., 2002. Priming in plant–pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, 7(5), 210-216.

Cordova-Kreylos, A., Fernandez, L., Koivunen, M., Yang, A., Flor-Weiler, L. y Marrone, P., 2013. Isolation and Characterization of *Burkholderia rinojensis* sp. nov., a Non-*Burkholderia cepacia* Complex Soil Bacterium with Insecticidal and Miticidal Activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), 7669-7678.

Damalas, C. y Eleftherohorinos, I., 2011. Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(5), 1402-1419.

De la Fuente, L., Thomashow, L., Weller, D., Baisa, N., Quagliotto, L., Chernin, L. y Arias, A., 2004. *Pseudomonas Fluorescens* UP61 Isolated From Birdsfoot Trefoil Rhizosphere Produces Multiple Antibiotics and Exerts a Broad Spectrum of Biocontrol Activity. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 671-681.

Dominati, E., Mackay, A., Green, S. y Patterson, M., 2014. A soil change-based methodology for the quantification and valuation of ecosystem services from agro-ecosystems: A case study of pastoral agriculture in New Zealand. *Ecological Economics*, 100, 119-129.

Domínguez-Arrizabalaga, M., Villanueva, M., Escriche, B., Ancín-Azpilicueta, C. y Caballero, P., 2020. Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Proteins against Coleopteran Pests. *Toxins*, 12(7), 430.

Droby, S.; Chalutz E. 1994. Mode of Action of Biocontrol Agents of Postharvest Disease. En: Biological control of postharvest diseases. 63-73. Edited for Wilson C.L. and Wisniewski M. E. CRC Press, Boca ratón.

Du Jardin, 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*. 196, 3-14.

Ducrot, PH. 2005. Organic chemistry's contribution to the understanding of biopesticida activity of natural products from higher plants. En: Regnault, RC;



Philogene BJJ; Vincent, C. eds. Biopesticides of plant origin. Lavoiser and Intercept, Ltd. Paris and Andover. 47-58.

Duke, S. y Powles, S., 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64(4), 319-325.

Duke, S., 2017. The history and current status of glyphosate. *Pest Management Science*, 74(5), 1027-1034.

Dunham, W.C., 2015. Evolution & Future of biocontrol. *The global biocontrol & biostimulants E.newsletter*.

Elad, Y., y R. Baker. 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium* sp. by *Pseudomonas* spp. *Ecol. Epidemiol.* 75 (9), 1053- 1059.

ELD, 2015. Report for policy and decision makers: Reaping Economic and Environmental Benefits from Sustainable Land Management. Economics of Land Degradation (ELD) Initiative, Bonn, Germany.

FAO. 2010. Food Balance Sheets. Disponible en : <http://www.fao.org/faostat/es/#data> [Accedido 21 Mayo 2021].

Ferrer, A., 2003. Intoxicación por plaguicidas. *Anales Sis San Navarra*, 26(1), 155-171.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M., Kostas, S., Driver, S. y Mello, C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811.

Gayder, S., Parcey, M., Nesbitt, D., Castle, A. y Svircev, A., 2020. Population Dynamics between *Erwinia amylovora*, *Pantoea agglomerans* and Bacteriophages: Exploiting Synergy and Competition to Improve Phage Cocktail Efficacy. *Microorganisms*, 8(9), 1449.

Ghorbanpour, M., Omidvari, M., Abbaszadeh-Dahaji, P., Omidvar, R. y Kariman, K., 2018. Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biological Control*, 117, 147-157.

Ginovart, M., Tutusaus, A. y Mas, M., 2019. Modelización basada en agentes: canibalismo microbiano. *Modelling in Science Education and Learning*, 12(2), 5-46.

Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., Marrone, P., Morin, L. y Stewart, A., 2012. Have biopesticides come of age? *Trends in Biotechnology*, 30(5), 250-258.

Glare, T., Jurat-Fuentes, J. y O'Callaghan, M., 2017. Chapter 4: Basic and Applied Research: Entomopathogenic Bacteria. En: L. Lacey, ed., *Microbial Control of Insect and Mite Pests*. Academic Press, 47-67.

Grijalba, E., Hurst, M., Ibarra, J. E., Jurat, J. L., y Jackson, T. 2018. Bacterias entomopatógenas en el control biológico de insectos. En: Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: agentes de control biológico. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Bogotá. 298–333.

Grzywacz, D., 2017. Chapter 3 - Basic and Applied Research: Baculovirus. In: L. Lacey, ed., *Microbial Control of Insect and Mite Pests*,. Academic Press, 27-46.

Gunatilaka, A., 2006. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. *Journal of Natural Products*, 69(3), 509-526.

Hajek, A. y St. Leger, R., 1994. Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts. *Annual Review of Entomology*, 39, 293-322.

Hammerschmidt, R., 1999. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55, 77-84.

Henn, T. y Weinzierl, R., 1989. Botanical insecticides and insecticidal soaps. [Urbana, Ill.]: University of Illinois at Urbana-Champaign, College of Agriculture, Cooperative Extension Service.

Hurley, P., Hill, R. y Whiting, R., 1998. Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. *Environmental Health Perspectives*, 106(8), 437-445.

ISAAA, 2016. *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016*. Ithaca, NY.

Kim, J., Park, B., Kim, S., Choi, D., Nahm, B., Moon, J., Reader, J., Farrand, S. y Hwang, I., 2006. Bases of biocontrol: Sequence predicts synthesis and mode of action of agrocin 84, the Trojan Horse antibiotic that controls crown gall. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(23), 8846-8851.

Köhl, J., Kolnaar, R. y Ravensberg, W., 2019. Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10(845).

Kollas, C., Kersebaum, K., Nendel, C., Manevski, K., Müller, C., Palosuo, T., Armas-Herrera, C., Beaudoin, N., Bindi, M., Charfeddine, M., Conradt, T., Constantin, J., Eitzinger, J., Ewert, F., Ferrise, R., Gaiser, T., Cortazar-Atauri, I., Giglio, L., Hlavinka, P., Hoffmann, H., Hoffmann, M., Launay, M., Manderscheid, R., Mary, B., Mirschel, W., Moriondo, M., Olesen, J., Öztürk, I., Pacholski, A., Ripoche-Wachter, D., Roggero, P., Roncossek, S., Rötter, R., Ruget, F., Sharif, B., Trnka, M., Ventrella, D., Waha, K., Wegehenkel, M., Weigel, H. y Wu, L., 2015. Crop rotation modelling—A European model intercomparison. *European Journal of Agronomy*, 70, 98-111.

Kopittke, P., Menzies, N., Wang, P., McKenna, B. y Lombi, E., 2019. Soil and the intensification of agriculture for global food security. *Environment International*, 132, 105078.

Lacey, L., Shapiro-Ilan, D. y Arthurs, S., 2008. Control microbiano de plagas de artrópodos de huertos en climas templados. En: L. Lacey, ed., *Control microbiano de plagas de insectos y ácaros. De la teoría a la práctica*. 2017. 253-267.

Lacey, L., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D., Frutos, R., Brownbridge, M. y Goettel, M., 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 1-41.

Lamberth, C., Jeanmart, S., Luksch, T. y Plant, A., 2013. Current Challenges and Trends in the Discovery of Agrochemicals. *Science*, 341(6147), 742-746.

Landolt, P. y Phillips, T., 1997. Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*, 42, 371-391.

Larsen, M., 1999. Biological control of helminths. *International Journal for Parasitology*, 29, 139-146.

Li, J., Strobel, G., Harper, J., Lobkovsky, E. y Clardy, J., 2000. ChemInform Abstract: Cryptocin, a Potent Tetramic Acid Antimycotic from the Endophytic Fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *ChemInform*, 2(6), 767-770.

Lu, Y., Song, S., Wang, R., Liu, Z., Meng, J., Sweetman, A., Jenkins, A., Ferrier, R., Li, H., Luo, W. y Wang, T., 2015. Impacts of soil and water pollution on food safety and health risks in China. *Environment International*, 77, 5-15.

Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. y Stahl, D., 2015. *Brock. biologia de los microorganismos*. 14th ed. Pearson Education.

Mansouri, M. y Berger, P., 2018. Baculovirus for gene delivery to mammalian cells: Past, present and future. *Plasmid*, 98, 1-7.

Martin, P., Hirose, E. y Aldrich, J., 2007. Toxicity of *Chromobacterium subtsugae* to Southern Green Stink Bug (Heteroptera: Pentatomidae) and Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, 100(3), 680-684.

Mascarin, G. y Jaronski, S., 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), 1-26.

McKinlay R, Dassyne J, Djamgoz M, Plant JA, Voulvoulis N ,2012. Agricultural pesticides and chemical fertilisers. En: Plant JA, Voulvoulis N, Ragnarsdottir KV (eds) *Pollutants, human health and the environment: a risk-based approach*, 1st edn. Wiley, West Sussex, 181–206.

McNeely, D., Chanyi, R., Dooley, J., Moore, J. y Koval, S., 2017. Biocontrol of *Burkholderia cepacia* complex bacteria and bacterial phytopathogens by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(4), 350-358.

Md Meftaul, I., Venkateswarlu, K., Dharmarajan, R., Annamalai, P. y Megharaj, M., 2020. Pesticides in the urban environment: A potential threat that knocks at the door. *Science of The Total Environment*, 711, 134612.

Mendoza Mora, J. R. 1993. Semioquímicos: Su rol en el control de plagas. Quevedo, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Tropical Pichilingue, Departamento de Entomología. (Comunicación Técnica nº 23).

Mapa.gob.es. 2021. [Registro de Productos Fitosanitarios] - Agricultura - *magrama.gob.es*. Disponible en: <<https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/menu.asp>> [Consultado el 12 de julio de 2021].

Mohler, C., 2009. Introduction. En: C. Mohler and S. Johnson, ed., *Crop Rotation on Organic Farms. A Planning Manual*. Ithaca, NY: NRAES.

Morton, V. y Staub, T., 2008. A Short History of Fungicides. *APSnet Feature Articles*,.

Nawaz, M., Mabubu, J. y Hua, H., 2016. Current status and advancement of biopesticides: Microbial and botanical pesticides. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(2), 241-246.

Newitt, J., Prudence, S., Hutchings, M. y Worsley, S., 2019. Biocontrol of Cereal Crop Diseases Using *Streptomyces*. *Pathogens*, 78(8).

Norin, T., 2007. Semiochemicals for insect pest management. *Pure and Applied Chemistry*, 79(12), 2129-2136.

Numan, M., Bashir, S., Khan, Y., Mumtaz, R., Shinwari, Z., Khan, A., Khan, A. y AL-Harrasi, A., 2018. Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review. *Microbiological Research*, 209, 21-32.

Oerke, E., 2005. Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43.

Olanrewaju, O., Glick, B. y Babalola, O., 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(197).

O'Sullivan, D. y O'Gara, F., 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiological Reviews*, 56(4), 662-676.

Pal, K.K. y McSpadden Gardener, B., 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*.

Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J. y Caballero, P., 2014. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins*, 6, 3296-3325.

Pappas, M., Baptista, P., Broufas, G., Dalakouras, A., Djjobbi, W., Flors, V., Guerfali, M., Khayi, S., Mentag, R., Pastor, V., Pereira, J., Sánchez- Bel, P. y Papadopoulou, K., 2020. Biological and Molecular Control Tools in Plant Defense. En: J. Mérillon y K. Ramawat, ed., *Plant Defense: Biological Control* , 2ª ed. 3-43.

Parker, K. y Sander, M., 2017. Environmental Fate of Insecticidal Plant-Incorporated Protectants from Genetically Modified Crops: Knowledge Gaps and Research Opportunities. *Environmental Science & Technology*, 51, 12049-12057.

Pieterse, C., Zamioudis, C., Berendsen, R., Weller, D., Van Wees, S. y Bakker, P., 2014. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347-375.

Prescott, L., Harley, J. y Klein, D., 2004. *Microbiología*. 5th ed. Madrid: McGraw-Hill, Interamericana de España.

Qu, S. y Wang, S., 2018. Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. *Developmental & Comparative Immunology*, 83, 96-103.

Qureshi, J. Michaud, J., 2005. Interactions among three species of cereal aphids simultaneously infesting wheat. *Journal of Insect Science*, 5(13).

Rai, M., Acharya, D., Singh, A. y Varma, A., 2001. Positive growth responses of the medicinal plants *Spilanthes calva* and *Withania somnifera* to inoculation by *Piriformospora indica* in a field trial. *Mycorrhiza*, 11(3), pp.123-128.

Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V. y Samiyappan, R., 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection*, 20, 1-11.

Raymond, B., Sayyed, A. y Wright, D., 2006. The compatibility of a nucleopolyhedrosis virus control with resistance management for *Bacillus thuringiensis*: Co-infection and cross-resistance studies with the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93, 114-120.

Raymond, B. y Federici, B., 2017. In defence of *Bacillus thuringiensis*, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity-a response to EFSA. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(7), 1-8.

Mapa.gob.es. 2021. [Registro de Productos Fitosanitarios] - Agricultura - magrama.gob.es. Disponible en : <<https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/productos/forexi.asp?e=0&susActiva=84>> [Accedido 1 Julio 2021].

Regnault-Roger, C., 2020. Trends for Commercialization of Biocontrol Agents (Biopesticide). En: J. Mérillon y K. Ramawat, ed., *Plant Defense: Biological Control*, 2ª ed. 445-471.

Rohr, J., Barrett, C., Civitello, D., Craft, M., Delius, B., DeLeo, G., Hudson, P., Jouanard, N., Nguyen, K., Ostfeld, R., Remais, J., Riveau, G., Sokolow, S. y Tilman, D., 2019. Emerging human infectious diseases and the links to global food production. *Nature Sustainability*, 2(6), 445-456.

Rubio Susan, V. y Fereres Castiel, A., 2005. Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos. In: I. Marín, J. Sanz and R. Amils, ed., *Biotechnología y medio ambiente*. Alcalá de Henares (Madrid): Ephemera, 215-229.

Ruij, L., 2015. Insect Pathogenic Bacteria in Integrated Pest Management. *Insects*, 6, 352-367.

Sagüés, M., Purslow, P., Fernández, S., Fusé, L., Iglesias, L. y Saumell, C., 2011. Hongos nematófagos utilizados para el control biológico de nematodos

gastrointestinales en el ganado y sus formas de administración. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28(4), 143-147.

Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R., Capell, T. y Christou, P., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, 9, 283-300.

Santoyo, G., Valencia Cantero, E., Orozco Maqueda, M., Peña Cabriaes, J. y Farías Rodríguez, R., 2010. Role of Siderophores in Antagonic Activity of *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 Against Plant Fungi. *Terra Latinoamericana*, 28(1), 53-60.

Sarwar, M., 2015. Information on Activities Regarding Biochemical Pesticides: An Ecological Friendly Plant Protection against Insects. *International Journal of Engineering and Advanced Research Technology (IJEART)*, 1(2).

Schünemann, R., Knaak, N. y Fiuza, L., 2014. Mode of Action and Specificity of *Bacillus thuringiensis* Toxins in the Control of Caterpillars and Stink Bugs in Soybean Culture. *ISRN Microbiology*, 2014, 1-12.

Seiber, J., Coats, J., Duke, S. y Gross, A., 2014. Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(48), 11613-11619.

Shafique, S., Shafique, S., Zameer, M. y Asif, M., 2019. Plant Defense System Activated in Chili Plants by Using Extracts from *Eucalyptus citriodora*. *Biocontrol Science*, 24(3), 137-144.

Shahid, A., Rao, Q., Bakhsh, A. y Husnain, T., 2012. Entomopathogenic fungi as biological controllers: New insights into their virulence and pathogenicity. *Archives of Biological Sciences*, 64(1), 21-42.

Sharma, N. y Singhvi, R., 2017. Effects of Chemical Fertilizers and Pesticides on Human Health and Environment: A Review. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 10(6), 675-679.

Sharma, A., Sandhi, R. y Reddy, G., 2019. A Review of Interactions between Insect Biological Control Agents and Semiochemicals. *Insects*, 10(439), 1-16.



Sharma, A., Shukla, A., Attri, K., Kumar, M., Kumar, P., Sutttee, A., Singh, G., Barnwal, R. y Singla, N., 2020. Global trends in pesticides: A looming threat and viable alternatives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 201 (110812), 1-15.

Shepherd, A., 1955. Formation of the Infection Bulb in *Arthrobotrys oligospora* Fresenius. *Nature*, 175(4454), 475-475.

Simoes, M., Belo, A., Pinto-Cruz, C. y Pinheiro, A., 2014. Natural vegetation management to conserve biodiversity and soil water in olive orchards. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 12(3), 633.

Singh, D. y Adak, T., 2014. *Advances in plant biopesticides*. Springer.

Syed Ab Rahman, S., Singh, E., Pieterse, C. y Schenk, P., 2018. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*, 267, 102-111.

Sun, Y., Li, H., Guo, G., Semple, K. y Jones, K., 2019. Soil contamination in China: Current priorities, defining background levels and standards for heavy metals. *Journal of Environmental Management*, 251, 109512.

Tembo, Y., Mkindi, A., Mkenda, P., Mpumi, N., Mwanauta, R., Stevenson, P., Ndakidemi, P. y Belmain, S., 2018. Pesticidal Plant Extracts Improve Yield and Reduce Insect Pests on Legume Crops Without Harming Beneficial Arthropods. *Frontiers in Plant Science*, 9(1425).

Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A. y Aronsson, A., 2017. Perspectives and Challenges of Microbial Application for Crop Improvement. *Frontiers in Plant Science*, 8(49).

Toghueo, R., Eke, P., Zabalgoceazcoa, Í., de Aldana, B., Nana, L. y Boyom, F., 2016. Biocontrol and growth enhancement potential of two endophytic *Trichoderma* spp. from *Terminalia catappa* against the causative agent of Common Bean Root Rot (*Fusarium solani*). *Biological Control*, 96, 8-20.

United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division 2015. World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables. Working Paper No. ESA/P/WP.241.

US EPA. 2016. *Basic Information about Pesticide Ingredients* | US EPA. Disponible en: <<https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients>> [Accedido 8 Abril 2021].

US EPA. 2016. *Biopesticides* | US EPA. Disponible en: <<https://www.epa.gov/pesticides/biopesticides#what>> [Accedido 9 Abril 2021].

US EPA. 2017. *EPA Registers Innovative Tool to Control Corn Rootworm* | US EPA. Disponible en : <<https://archive.epa.gov/epa/newsreleases/epa-registers-innovative-tool-control-corn-rootworm.html>> [Accedido 19 Mayo 2021].

Van Alfen, NK., 2001. Fungal Pathogens of Plants. *Encyclopedia of Life Sciences*,.

Van Bruggen, A., He, M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K., Finckh, M. y Morris, J., 2018. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of The Total Environment*, 616-617, 255-268.

Van Gelderen, A., 2009. Micoparasitismo biotrófico de *Fusarium oxysporum* sobre *Cunninghamella* sp. *Boletín Micológico*, 24, 51-56.

Van Lenteren, J., 2012. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *BioControl*, 57(1), 1-20.

Van Lenteren, J., Bolckmans, K., Köhl, J., Ravensberg, W. y Urbaneja, A., 2018. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl*, 63, 39-59.

Van Peer, R., 1991. Induced Resistance and Phytoalexin Accumulation in Biological Control of *Fusarium* Wilt of Carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. *Phytopathology*, 81, 728-734.

Vero, S., 2006. Mecanismos de biocontrol. En: S. Vero and P. Mondino, ed., *Control biológico de patógenos de plantas*. Montevideo, Uruguay: Departamento de Publicaciones Facultad de Agronomía, 49-78.

Vincent, C., Hallman, G., Panneton, B. y Fleurat-Lessard, F., 2003. Management of Agricultural Insects with physical control methods. *Annual Review of Entomology*, 48, 261-281.

Vos, C., Yang, Y., De Coninck, B. y Cammue, B., 2014. Fungal (-like) biocontrol organisms in tomato disease control. *Biological Control*, 74, 65-81.

Wang, G., Liu, Z., Lin, R., Li, E., Mao, Z., Ling, J., Yang, Y., Yin, W. y Xie, B., 2016. Biosynthesis of Antibiotic Leucinostatins in Bio-control Fungus *Purpureocillium lilacinum* and Their Inhibition on *Phytophthora* Revealed by Genome Mining. *PLOS Pathogens*, 12(7), 1-30.

Wang, C. y Wang, S., 2017. Insect Pathogenic Fungi: Genomics, Molecular Interactions, and Genetic Improvements. *Annual Review of Entomology*, 62, 73-90.

Weiss, B., Amler, S. y Amler, R., 2004. Pesticides. En: *Pediatrics*. 1030-1036.

Wennmann. J.T., Pietruska D. y Jehle J.A., 2021. Transcriptome of *Cydia pomonella* granulovirus in susceptible and type I resistant codling moth larvae. *Journal of General Virology*, 02:001566.

Wisniewski, M., Biles, C., Droby, S., McLaughlin, R., Wilson, C. y Chalutz, E., 1991. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39, 245-258

## ANEXO I. TABLAS

**Tabla 1:** Clasificación química de los distintos insecticidas sintéticos, su mecanismo de acción y ejemplos.  
(Weiss *et al.*, 2004).

Clasificación química	Mecanismo de acción	Ejemplos
<b>Organoclorados</b>	La despolarización de las membranas nerviosas altera la función del sistema nervioso	DDT, Lindano
<b>Organofosforados</b>	La inhibición de la acetilcolinesterasa altera la función del sistema nervioso	Malation, Diazinon
<b>Carbamatos</b>	La inhibición de la acetilcolinesterasa altera la función del sistema nervioso	Aldicarb, Carbaryl
<b>Piretroides</b>	La alteración de la permeabilidad de la membrana nerviosa a los iones de sodio altera la función del sistema nervioso	Deltametrin, Permethrin

**Tabla 2:** Algunos extractos de plantas empleados como biopesticidas (Nawaz *et al.*, 2016).

Producto vegetal empleado como biopesticida	Plaga objetivo
<b>Limoneno y Linalol</b>	Pulgas, pulgones y ácaros, hormigas de fuego, varios tipos de moscas, avispas de papel y grillos domésticos
<b>Neem</b>	Variedad de insectos chupadores y masticadores
<b>Piretro y Piretrinas</b>	Hormigas, pulgones, cucarachas, pulgas, moscas y garrapatas
<b>Rotenona</b>	Insectos que se alimentan de hojas, como pulgones, ciertos escarabajos (escarabajo del espárrago, escarabajo de la hoja del frijol, escarabajo de la patata de Colorado, escarabajo del pepino, escarabajo pulga, escarabajo de la hoja de la fresa y otros) y orugas, así como pulgas y piojos en animales
<b>Ryania</b>	Orugas (como gusano aéreo del maíz) y chinches
<b>Sabadilla</b>	Chinches, chinches arlequín, saltamontes de hojas y chinches hediondas

**Tabla 3:** Principales ingredientes activos registrados en EE. UU. como agentes de biocontrol (Arthurs y Dara, 2019).

Active Ingredient <sup>a</sup>	Strain(s) <sup>b</sup>	Year registered <sup>c</sup>	Trade name(s) [registrant(s)] <sup>c</sup>	REI (hr)	Preharvest (day)	Organic <sup>d</sup>	Target(s)
<b>Bacteria</b>							
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	ABTS-1857 GC91	1991 1992	XenTari (Valent USA), Agree WG (Certs USA)	4 4	0 0	Yes Yes	Caterpillars Caterpillars
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	ABTS-351	1971	Biobit HP, DiPel DF (Valent USA)	4	0	Yes	Caterpillars
	SA-11	1971	Javelin WG (Certs USA)	4	0	Yes	Caterpillars
	SA-12	1971	Deliver, CoStar (Certs USA)	4	0	Yes	Caterpillars
	EG2348	1994	Condor WP (Certs USA)	4	0	Yes	Caterpillars
	EG7841	2002	Cymax (Certs USA)	4	0	No	Caterpillars
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>galleriae</i>	SDS-502	2013	boreGONE! (Phyllo BioProducts)	4	0	Yes	Certain beetles
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i>	SA-10	2016	Trident (Certs USA)	4	0	Yes	Colorado potato ( <i>L. decemlineata</i> ) and elm leaf ( <i>P. luteola</i> )
	NB176	1988	Novodor (Valent USA)	4	0	No	beetle larvae
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	BMP144	1982	AquaBac 200/400G/xi/DF3000 (Becker Microbial Products)	0	0	No	Mosquitoes, blackflies, fungus gnats, and other nuisance flies
	BMP123	1993	BMP 123 (Becker Microbial Products)	0	0	No	
	AM65-52	1982	Gnatrol WDG, VectoBac (Valent USA)	4	0	Yes	
	SA3 A	1982	Teknar HP-D (Valent USA)	0	0	No	
	1-1582	2008	Norica WP, VOTIVO FS seed treatment (Bayer)	4	0	No	Plant parasitic nematodes
<i>Bacillus sphaericus</i>	2362, strain ABTS 1743	2000	VectoLex FG (Valent Biosciences)	0	0	No	Mosquito larvae
<i>Burkholderia rhizogensis</i>	A396 (heat killed)	2014	Venerate XC, (Marrone Bio Innovations)	4	0	Yes	Broad spectrum insecticide/acaricide
			Majestene (Marrone Bio Innovations)	4	0	Yes	Bionematicide
<i>Chromobacterium subsugae</i>	PRAA4-1T	2011	Grandevo (Marrone Bio Innovations)	4	0	Yes	Broad spectrum insecticide/acaricide
<i>Praenobacillus popilliae</i>	Bacterial spores	1987	Milky Spore Powder (St Gabriel Organics)	0	0	Yes	Japanese beetle, <i>Popillia japonica</i>
<i>Pasteuria</i> spp.	<i>P. nishizawae</i> (Ph1)	2012	Clariva pn seed treatment, (Syngenta)	4	0	No	Plant parasitic (cyst) nematodes
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CL145A (heat killed)	2013	Zequanox (Marrone Bio Innovations)	12	na	na	Zebra and quagga dreissenid mussels
<b>Fungi</b>							
<i>Beauveria bassiana</i>	GHA	1995	BotaniGard ES/WP, Mycotrol (Lam International)	4	0	Some	Thrips, aphids, whiteflies, plant bugs, mites and other arthropods
<i>B. bassiana</i> combination	ATCC 74,040	1995	Naturalis L (Troy BioSciences)	4	0	No	
	ANT-03	2014	BioCeres WP (BioSafe)	4	0	Yes	
	HF23	2006	BaEnce (Terrigena)	0	0	Yes	House flies in livestock and poultry production
	PPRI5539	Pending	Velfer (BASF)				Thrips, aphids, whiteflies and other arthropods
	R444	Pending	Bb-Protec (Andermatt)				
<i>Myrothecium verrucaria</i>	GHA + neem oil	2016	XPulse (Lam International)	48	0	No	Whitefly, aphids, thrips, scales and other leaf feeding insects
	GHA + pyrethrins	2016	Botanigard MAXX (Lam International)	12	0	No	
	AARC-0255	2000	DTera DF/WDG (Valent USA)	4	0	No	Plant parasitic nematodes
<i>Metarhizium brunneum</i> ( <i>anisopliae</i> s.l.)	F52	2003	Met-52 EC and Met-52 G (Novozymes)	0 (soil) or 4	0	No	Thrips, whiteflies, mites, weevils and ticks
<i>Isaria fumosorosea</i> (formerly <i>Pacilomyces fumosoroseus</i> )	Apopka 97 FE 9901	1998 2011	PER-97 WDG (Certs USA), Ancora (OHP) NoFly WP (Futureco)	4 4	0 0	Yes Yes	Whiteflies, aphids, thrips, leafminers, plant bugs, mites, some soil pests
<i>Paranosema locustae</i>		1982	Semaspore Bait (Planet Natural), Nolo Bait (M&R Durango)	0	0	Yes	Grasshoppers and Mormon crickets (rangeland)
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (formerly <i>Pacilomyces lilacinus</i> )	25 1	2005	MeloCon WG (Bayer)	4	0	Yes	Plant parasitic nematodes
<b>Granulosis virus (GV)</b>							

(continued on next page)

Active Ingredient <sup>a</sup>	Strain(s) <sup>b</sup>	Year registered <sup>b</sup>	Trade name(s) [registrant(s)] <sup>c</sup>	REI (hr)	Preharvest (day)	Organic <sup>d</sup>	Target(s)
<i>Cydia pomonella</i> (CpGV)	Mexican	2000	Cyd-X, Cyd-X HP (Certis USA) Virosoft CP4 (BioTEPP)	4 4	0 0	Yes Yes	Codling moth, <i>C. pomonella</i>
	V22	2013	Carpovirusine (Arysta) Madex HP (Andermatt Biocontrol)	12 4	0 0	No Yes	Codling moth and oriental fruit moth
<i>Plodia interpunctella</i> GV		2001	NutGuard, FruitGuard (Agrivir)	4	0	No	Indianmeal moth
<b>Nucleopolyhedrovirus (NPV)</b>							
<i>Helicoverpa</i> spp.	<i>H. zea</i> (HzNPV) <i>H. armigera</i> (HearNPV)	1992 2015	Gemstar LC (Certis), Heligen (AgBiTech) Helicovex (Andermatt)	4 4	0 0	Yes Yes	Corn earworm ( <i>H. zea</i> ), cotton bollworm ( <i>H. armigera</i> ), tobacco budworm ( <i>H. virescens</i> )
<i>Spodoptera exigua</i>	SeNPV	2015	Spod-X LC (Certis USA), Spexit (Andermatt)	4	0	Yes	Beet armyworm, <i>S. exigua</i>
<i>Autographa californica</i>	AcNPV	Pending	Loopex (Andermatt/Sylvar)	0	0	No	Cabbage looper, <i>Trichoplusia ni</i>
<i>Orgyia pseudotsugata</i>	OpNPV	1976	TM-Biocontrol, (US Forest Service)	0	0	No	Douglas fir tussock moth, <i>O. pseudotsugata</i>
<i>Lymantria dispar</i>	LdMNPV	1978	Gypcheck (US Forest Service/Sylvar)	0	0	No	Gypsy moth, <i>L. dispar</i>

**Tabla 4:** Algunas formulaciones comercializadas en España (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2021)

Sustancia activa	Formulación
<b><i>Beauveria bassiana</i> (Cepa GHA)</b>	<i>Beauveria bassiana</i> (Cepa GHA) 10,7 % (2,26X10 <sup>13</sup> conidias/L) [OD] P/V
<b><i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i></b>	<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i> 32 % ( <i>kurstaki</i> 30.36, Cepa SA-11; 32 MIL. DE U.I./G) (ESP) [WG] P/P
<b><i>Trichoderma asperellum</i> (Cepa ICC012)</b>	<i>Trichoderma asperellum</i> (Cepa ICC012) 2 % + <i>Trichoderma gamsii</i> (Cepa ICC080) 2 % (3X 10 <sup>7</sup> CFU/G (suma de ambos microorganismos)) [WP] P/P
<b>Virus Granulosis Carpocapsa-V15</b>	Virus Granulosis Carpocapsa-V15 1 % [SC] P/V
<b>Spinosad</b>	Spinosad 48 % [SC] P/V

## ANEXO II. FIGURAS

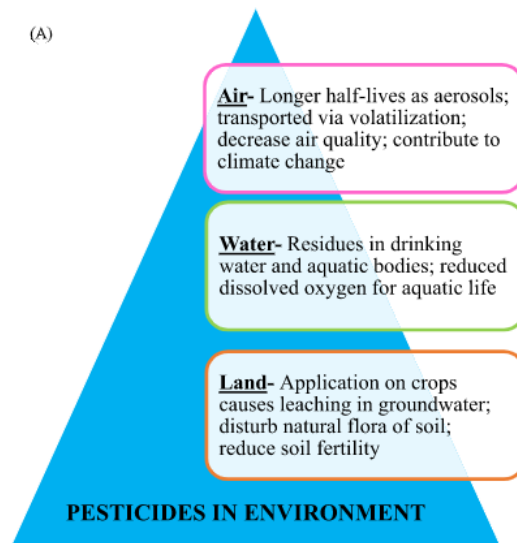


Figura 1: Efectos de los pesticidas en el medio ambiente (Sharma *et al.*, 2020).

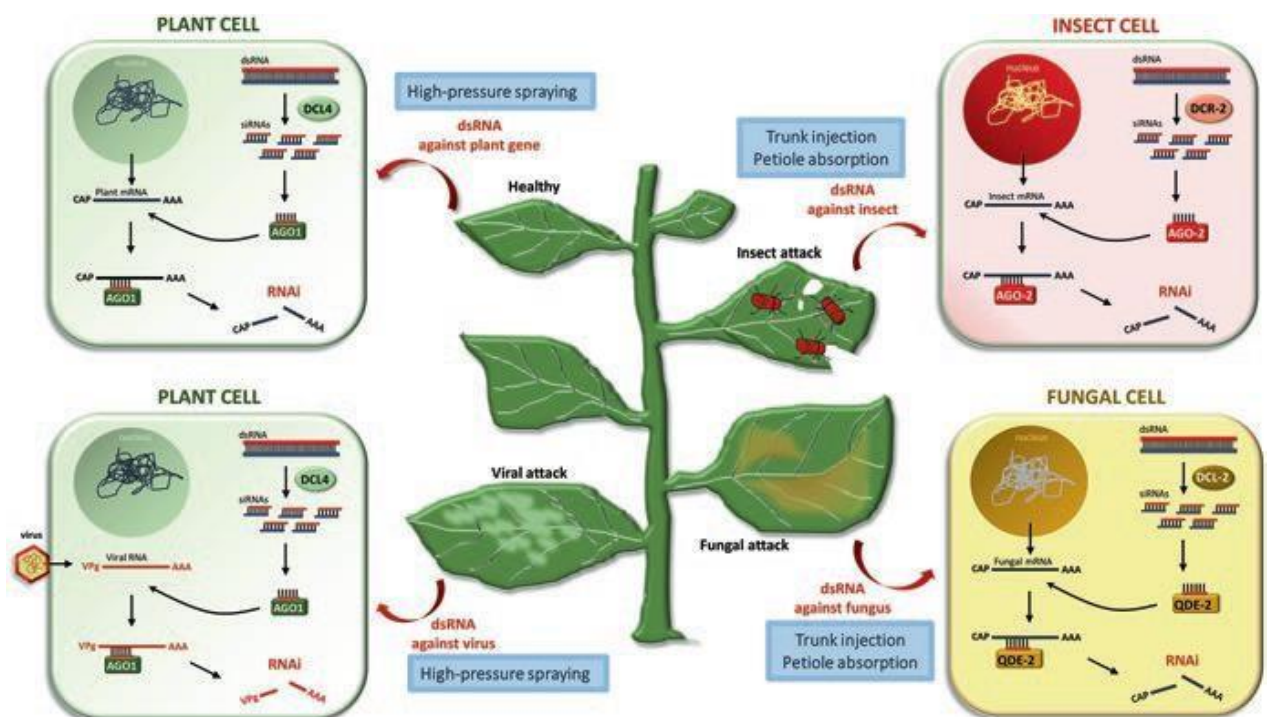
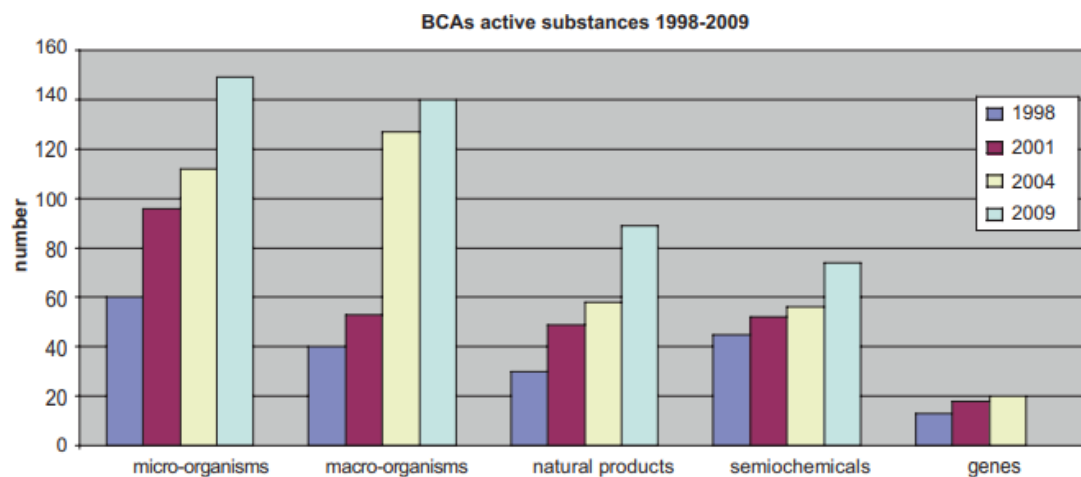


Figura 2: Las herramientas de control biológico basado en dsARN implican la aplicación exógena de moléculas de dsARN transcritas in vitro y/o in vivo en las plantas con el objetivo de desencadenar la producción de siRNA contra (1) genes de plantas/algas, (2) virus/viroides, (3) hongos/oomicetos y (4) insectos/ácaros (Pappas *et al.*, 2020).





**Figura 3:** Desarrollo de microorganismos como principal ingrediente activo de los agentes de biocontrol en la última década (Regnault-Roger, 2020).